ISTITUTO D'IGIENE DELLA SCUOLA VETERINARIA DI PISA

Direttore: Prof. D. OTTOLENGHI

D. OTTOLENGHI

La preparazione del vaccino anticolerico per le truppe.

Estratto da "l'Igiene Moderna,,

PERIODICO MENSILE

ANNO VIII — Numero 11 — Novembre 1915

STABILIMENTO TIPOGRAFICO
E. PALAGI & C.
TELEFONO 57-29
:: GENOVA ::
VIA SERRA, N. 7

ISTITUTO D'IGIENE DELLA SCUOLA VETERINARIA DI PISA
Direttore: Prof. D. OTTOLENGHI

D. OTTOLENGHI

La preparazione del vaccino anticolerico per le truppe.

Estratto da "l' Igiene Moderna,,
PERIODICO MENSILE
ANNO VIII — Numero 11 — Novembre 1915

STABILIMENTO
TIPOGRAFICO
E. PALAGI & C.
TELEFONO 57-29
:: GENOVA ::
VIA SERRA, N. 7

ISTITUTO D' IGIENE DELLA SCUOLA VETERINARIA DI PISA

Direttore: Prof. D. OTTOLENGHI

D. OTTOLENGHI

La preparazione del vaccino anticolerico per le truppe. [1]

I requisiti cui deve soddisfare un metodo di preparazione dei vaccini batterici per corrispondere bene nelle condizioni eccezionali, create dallo stato di guerra, sono sopratutto questi: 1° che le manipolazioni, alle quali si sottopongono le culture, siano semplici, rapide e non pericolose, sì da poterle eseguire, quando occorra, con l'aiuto di personale poco addestrato e in laboratorî non appositamente destinati alla produzione dei vaccini, avendosi ugualmente un prodotto, non solo poco costoso, ma di composizione fissa e costante; 2° che le proprietà pirogene e, in genere, tossiche dei batterî siano o abolite o molto diminuite, mentre ne vengano il meno possibile alterate le proprietà immunizzanti.

La soluzione attuale del problema sta nell'uso di colture uccise col calore o in altra maniera, che si sogliono inoculare sotto cute. Più comoda sarebbe la somministrazione per bocca, intorno alla quale non mancano esperimenti incoraggianti ma ancora troppo scarsi; mentre non è conveniente, per ora almeno e per ragioni ovvie, ricorrere alle inoculazioni endo-venose, sebbene queste, a cagione della rapidità degli effetti immunizzanti e del minor numero di iniezioni che richiedono, abbiano pregi rilevanti anche dal punto di vista delle necessità militari.

Limitandoci qui al caso del vaccino anticolerico, si deve però notare che vi può essere qualche dubbio nella scelta del modo di uccidere le colture di vibrioni colerigeni, se cioè convenga ricorrere al riscaldamento, secondo il procedimento Pfeiffer-Kolle, sperimentato nella pratica con molta larghezza, oppure al trattamento con sostanze chimiche.

Tale dubbio è tanto più giustificato, quanto ricerche molto recenti di Vincent (2) tenderebbero a dare al trattamento delle colture con etere, già

(1) I risultati di queste ricerche vennero già riassunti in un articolo comparso nel *Policlinico* (Sezione Pratica — 8 agosto 1915).

(2) C. R. Acad. Sc. 1915, T. 160, pag. 378.

proposto e sperimentato per il tifo, il valore di un metodo generale per la preparazione di *vaccini con alto potere immunizzante, con poca tossicità,* e certamente superiori quindi a quelli allestiti mediante il riscaldamento. Ma per vero, coteste ricerche di Vincent, in quanto riguardano il colera, non paiono, anche per il numero, abbastanza persuasive; onde io, alcuni mesi fa, quando già ritenevo inevitabile la vaccinazione delle nostre truppe contro il colera, ho creduto opportuno di controllare le osservazioni di quell'autore, studiando in pari tempo, con intenti eminentemente pratici, qualche altro mezzo di uccisione dei vibrioni, o nuovo o imperfettamente conosciuto.

I.

I mezzi di uccisione dei vibrioni da me esaminati furono dunque i seguenti: riscaldamento, etere, cloroformio, acido cloridrico, cloruro mercurico, ipoclorito di calcio.

Il riscaldamento, della durata di un'ora, si fece a 53° o a 60°, su emulsioni dei batterî in soluzione fisiologica di NaCl. Una parte di queste emulsioni servì pure per la preparazione del vaccino tipo Neisser-Shiga-Sclavo: si lasciavano per ciò le emulsioni in autolisi 24 ore a 37°, e poi si filtravano attraverso un filtro Berkefeld.

L'azione dell'etere si studiò in due modi: o esponendo ai vapori di etere, entro capsule di Tyndall, le emulsioni batteriche distese in strato sottile nelle capsule di Petri, oppure agitando le emulsioni con etere in eccesso entro ai comuni separatori a rubinetto, secondo il procedimento caldeggiato da Vincent. Siccome questi non ha pubblicati i particolari del suo metodo, io, dopo alcune prove, pensai di operare nella maniera seguente: l'emulsione batterica veniva portata con le opportune cautele entro a un separatore a rubinetto contenente già una certa quantità di etere, affinchè si mescolasse con questo prima di giungere al rubinetto e fosse così evitato l'inquinamento del tubo del separatore e l'infezione delle mani dell'operatore; si aggiungeva quindi altro etere in eccesso e si cominciava ad agitare dolcemente, senza rovesciare l'apparecchio. Quando la mescolanza era divenuta abbastanza completa si turava superiormente il separatore col tappo, lo si rovesciava e si agitava con cura, aprendo sovente il rubinetto: ormai non vi era più pericolo che in quest'operazione un po' di materiale, incompletamente sterilizzato dall'etere, venisse proiettato fuori.

Il liquido lasciato a sè si separava lentamente, e cioè in 24-48 ore, in tre strati: uno strato inferiore giallastro mediocremente torbido — che serviva da vaccino — uno strato mediano sottile bianco-opaco e uno strato superiore limpido di etere. Queste manipolazioni, per quanto semplici, devono venire eseguite con molta cautela, sia per i pericoli derivanti dall'etere e sia per evitare, come già si è accennato, proiezioni o infiltrazioni di emulsione batterica non ancora uccisa dall'etere.

Il cloroformio fu usato invece solamente sotto forma di vapori.

L'acido cloridrico, nella concentrazione dell' 1 $^0/_{00}$, venne scelto tenendo conto della notissima sensibilità che il vibrione del colera ha verso gli acidi, i quali paiono per ciò rappresentare, almeno fino ad un certo segno, dei microbicidi specifici per quel batterio, capaci di ucciderlo forse senza modificarne notevolmente la costituzione e la proprietà antigene.

Per quanto riguarda l'acido arsenioso, la scelta fu pure suggerita dal

desiderio di vedere se esso abbia per il vibrione del colera speciali affinità, come verso altri germi, e in qual maniera agisca sui componenti immunizzanti di questo batterio.

Considerazioni analoghe mi persuasero a sperimentare l' ipoclorito di calcio, straordinariamente efficace sul vibrione del colera, pure in concentrazioni debolissime. Le soluzioni vennero preparate col cloruro di calce del commercio e rese limpide mediante filtrazione attraverso amianto: il loro titolo si determinava al momento dell'uso.

Per confronto con l'acido cloridrico, microbicida di speciale efficacia per il vibrione, fu saggiato il cloruro mercurico, che è invece un microbicida di azione molto più generale ed intensa. Fu adoperato all' 1 : 20 mila, concentrazione evidentemente non pericolosa per i vaccinandi.

Alcune prove eseguite con questi diversi agenti, per fissare il tempo occorrente alla uccisione di dense emulsioni acquose di vibrioni del colera, diedero i seguenti valori medî:

l'etere (vapori) uccide i vibrioni del colera in meno di 5 ore (1)

il cloroformio (vapori) uccide i vibrioni del colera in meno di 5 ore

l' acido cloridrico 1 $^0/_{00}$ uccide i vibrioni del colera in più di 4 ore e in meno di 19 ore

l'acido arsenioso 1 $^0/_{00}$ non uccide i vibrioni neppure dopo 19 ore

l'acido arsenioso 0,5 $^0/_0$ uccide i vibrioni in meno di 24 ore

l' ipoclorito di calcio 0,39 $^0/_{00}$ uccide i vibrioni in meno di 4 ore

il cloruro mercurico 1:20000 uccide i vibrioni in meno di 24 ore

il riscaldamento a 53° o a 60° uccide i vibrioni in meno di 1 ora.

Si prepararono allora con patine di colture in agar (2) di 16-18 ore emulsioni molto dense di vibrioni del colera e si sottoposero ai trattamenti già indicati durante il tempo riconosciuto sicuramente sufficiente a conseguire la uccisione di tutti i germi. Siccome si partiva da un' unica emulsione, che si divideva poi in tante frazioni quanti erano i tipi di vaccino, era facile stabilire il contenuto batterico di ognuna di queste, determinando a parte, per mezzo di colture in piastre di agar, il numero di vibrioni presenti nell' emulsione madre. Con tale valore si calcolava pure la quantità di soluzione fisiologica da aggiungersi a ciascuna frazione per portare il contenuto di corpi microbici nei vaccini a un certo valore prestabilito (3).

Controllata la sterilità del vaccino, se ne inoculava poi 1 cm.^{3} sotto cute a conigli tutti press' a poco di egual peso. Solamente il vaccino allestito con HCl venne trattato prima dell'uso con soluzione di carbonato sodico fino a debole alcalinizzazione: degli altri agenti chimici non si fece la neutralizzazione, ma i vaccini con etere e con cloroformio furono lasciati qualche ora a 37° finchè avessero perso quasi completamente l'odore di quelle due sostanze.

---

(1) I vibrioni trattati con etere liquido furono sempre trovati uccisi al momento in cui si separarono dall'estratto etereo.

(2) L'agar, come si consiglia per le culture di vibrione del colera, era alcalinizzato aggiungendovi, dopo raggiunto il punto di neutralità al tornasole, il 3 $^0/_0$ di carbonato sodico cristallizzato al 10 $^0/_0$.

(3) Per il vaccino Neisser-Shiga-Sclavo e per il vaccino Vincent, si ammise che ogni cm.^{3} del prodotto (filtrato oppure liquido separatosi dopo il trattamento con etere, svaporato l'etere) corrisponda a 1 cm.^{3} dell' emulsione batterica adoperata.

II.

Fra i diversi modi che abbiamo per valutare la reazione immunizzante consecutiva all'iniezione vaccinale, scelsi anzitutto la titolazione delle agglutinine e la titolazione delle batteriolisine *in vitro*: la prima è usata di regola, e spesso da sola, appunto per giudicare nell'uomo la bontà o meno di un metodo di vaccinazione, e la seconda, che serve a riconoscere la comparsa o l' intensificarsi di un' azione distruggitrice diretta del microrganismo, è particolarmente adatta nel caso del vibrione del colera, perchè la batteriolisi di questo germe ha caratteri di grande evidenza e precisione. Certo, sarebbe stato anche più dimostrativo ricorrere alla batteriolisi nella cavia secondo il metodo classico di Pfeiffer, ma ciò avrebbe richiesto il sacrifizio di un numero assai grande di animali di cui non potevo assolutamente disporre: e poi la prova *in vitro* è tale, per la rapidità e per la semplicità, da essere pure applicabile allo studio di sieri umani tolti ai vaccinati, onde la sua scelta rende più agevoli i confronti, che io riterrei veramente preziosi, del modo di reagire dell'uomo e dei comuni animali ad un medesimo vaccino, anche per rispetto alla produzione delle batteriolisine, della quale potrebbero così indagarsi meglio il significato e l' importanza.

La titolazione delle agglutinine venne eseguita con il saggio macroscopico su 1 cm.³ di miscela: siero o diluzione di siero + coltura, e con lettura dei risultati dopo due ore a 37°. La prova della batteriolisi si fece pure su 1 cm.³ di miscela, allestita aggiungendo prima

TABELLA I.

Vaccinazione con 50 milioni di vibrioni colerigeni sotto cute — Conigli di circa gr. 1500
Salasso dopo 7 giorni

AGENTE D'UCCISIONE DEI VIBRIONI	Agglutinazione — Concentrazione del Siero 1 : 100	1 : 200	1 : 400	Batteriolisi — Concentrazione del Siero 1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
53° per un'ora . . .	completa	completa	+++	...	...	...	+
id. . . .	completa	completa	+++	...	...	...	+
Acido cloridrico 1 °/₀₀	completa	completa	++	...	...	+	—
Acido arsenioso 1 : 200	++	++	+	...	+	—	—
Cloruro mercurico 1 : 20000	completa	completa	+++	...	+	—	—
Ipoclorito di calcio 0.39 °/₀₀	completa	+++	+	...	+	—	—
Vapori di etere . . .	completa	completa	+	...	+	—	—
Vapori di cloroformio	+++	+	—	+ ?	—	—	—

TABELLA II.

Vaccinazione con 35 milioni di vibrioni colerigeni sottocute — Conigli di circa gr. 1500
Salasso dopo 7 giorni

AGENTE D'UCCISIONE DEI VIBRIONI	Agglutinazione — Concentrazione del Siero				Batteriolisi — Concentrazione del siero			
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
53° per un'ora . . .	completa	+++	++	+	...	...	+	— (1)
id. (b) . .	completa	completa	+++	+++	...	...	...	+
60° per un'ora . . .	++	±	—	—	...	...	...	+
id. . . .	+++	++	±	—	...	...	...	+
53° per un'ora e filtrazione dell'autolizzato a 37° per 24 ore .	+++	++	±	—	...	...	+	—
60° per nn'ora e filtrazione dell'autolizzato a 37 per 24 ore .	+++	+++	++	+	...	...	+	—
Cloruro mercurico 1 : 20000	+++	+	—	—	...	...	+	—
Ipoclorito di calcio 0.35 ‰	++	—	—	—	...	...	...	+
Etere (liquido) (2) . .	completa	+++	++	±	...	...	+	—
» » (c) . .	+++	++	+	—	...	+	—	—
» (vapori) . . .	completa	+++	++	±	...	...	+	—

al siero, previamente riscaldato 1 ora a 59°-60°, l'alessina, poi la coltura e portando a volume con soluzione fisiologica di NaCl. La dose più conveniente di alessina, rappresentata da siero fresco di cavia, risultò quella di cm.^{3} 0,1; il periodo di incubazione a 37° fu di due ore. Dopo questo tempo le varie miscele vennero agitate e quindi esaminate con preparati in goccia pendente e con preparati fissati e colorati coll' azzurro di Löffler.

Nelle tabelle I e II sono indicati i risultati di 2 serie di esperienze con i sieri dei conigli vaccinati un'unica volta 7 giorni avanti il salasso. Il segno +, nella prova di Pfeiffer, significa che nel

(1) Si aveva, anche a questa concentrazione, notevole batteriolisi, sebbene non completa: il titolo del siero era dunque realmente di poco inferiore all' 1 : 800.

(2) In questo caso la quantità di vaccino inoculata corrispondeva a 140 milioni di vibrioni.

preparato vi sono moltissimi granuli e pochissimi vibrioni intatti, ossia che la batteriolisi può considerarsi completa. I segni riguardanti l'agglutinazione sono i soliti, e non hanno quindi bisogno di alcuna spiegazione.

Il fatto che risulta più chiaramente da queste tabelle e che aveva il maggiore interesse per me, preoccupato sopratutto di giungere ad una conclusione pratica circa il metodo da scegliersi per preparare il vaccino anticolerico, è il seguente: l'uccisione dei vibrioni con il riscaldamento a 53°, fornisce vaccini ad azione molto costante ed energica. Seguono per bontà di effetti, il trattamento con vapori d'etere o con etere liquido e il riscaldamente a 60°; non ha corrisposto molto il vaccino tipo Neisser-Shiga-Sclavo. L'acido cloridrico ha agito abbastanza bene, meglio dell'acido arsenioso, ma non tanto certo da farlo credere preferibile al riscaldamento. Nel caso mio poi, non si è osservata quell'azione elettiva del cloroformio sull'agglutinogeno descritta da Friedberger e Moreschi (1): qui anzi si è verificato il fatto opposto, alterazione evidente del lisinogeno, scarsissima dell'agglutinogeno. Ma le condizioni dell' esperimento non sono intieramente eguali; e però non è possibile altra conclusione sicura se non che il cloroformio non è raccomandabile per il nostroscopo.

Per decidere ora se si doveva dare definitivamente la preferenza al riscaldamento, credetti utile di esaminare ancora questi punti: 1° la persistenza delle immunine nei conigli vaccinati una unica volta; 2° l' azione protettrice dei vaccini nella cavia; 3° comportamento dell'organismo umano a questi diversi vaccini.

Nella tabella III è indicato l' esito della prova sulla persistenza delle agglutinine e delle batteriolisine, eseguita 20 giorni dopo il salasso, cui si riferisce la tabella II, e su quei medesimi conigli.

TABELLA III.

TIPO DI VACCINO USATO	Agglutinazione — Concentrazione del Siero				Batteriolisi — Concentrazione del Siero			
	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 100	1 : 200	1 : 400	1 : 800
Vibrioni uccisi a 53° (2)	completa	+++	+++	++	+	±	—	—
Vibrioni uccisi a 53° e poi filtrati per Berkefeld	completa	+	—	—	—	—	—	—
Vibrioni uccisi con etere liquido (3) . . .	completa	++	—	—	—	—	—	—
Vibrioni uccisi con vapori d'etere . . .	completa	+++	++	±	+	—	—	—

(1) Centralbl. f. Bakter., I Abth., Orig., Bd 39, pag. 453, 1905.

(2) Coniglio segnato con (b) nella Tabella 2.

(3) Coniglio segnato con (c) nella Tabella 2.

I conigli vaccinati con vibrioni uccisi a 53° o con i vapori di etere sono dunque quelli in cui agglutinine e batteriolisine persistono più a lungo. Il vaccino tipo Vincent, sebbene preparato anch' esso con l'etere, darebbe risultati notevolmente inferiori: forse la disgregazione subita dai corpi batterici nel trattamento Vincent, mentre ne rende più facile e pronto il riassorbimento, fa sì che l' antigene scompaia presto dall'organismo e venga così a mancare una causa della persistenza delle immunine negli animali vaccinati, alla quale forse non si è dato finora sufficiente importanza.

Nella tabella IV sono indicate le esperienze intorno al valore protettivo. La coltura di vibrione colerigeno usata

TABELLA IV.

Prove di vaccinazione nella Cavia

TIPO DI VACCINO USATO	DOSE DEL VACCINO	ESITO DELLA INOCULAZIONE DELLA COLTURA	OSSERVAZIONI
Vibrioni uccisi a 53°	1 miliardo di vibrioni	Sopravvive	Non hanno presentato alcun disturbo.
	500 miloni »	»	
	100 » »	»	
Vibrioni uccisi a 53° e filtrati per Berkefeld	1 miliardo »	»	Restano molto abbattute per qualche ora dopo l' inie zione della coltura.
	500 milioni »	»	
	100 » »	»	
Vibrioni uccisi con etere liquido	28 miliardi »	»	Non hanno presentato alcun disturbo.
	1 » »	»	
	500 milioni »	»	
	100 » »	»	
Vibrioni uccisi con i vapori d'etere	1 miliardo »	Trovata morta dopo 18 ore.	Sono state sempre molto abbattute dopo l' iniezione della coltura.
	500 milioni »	Muore dopo 24 ore	
	100 » »	Trovata morta dopo 18 ore.	
— (1)	—	Trovate morte dopo 24 ore.	
—	—		
—	—		

N. B. — L' autopsia e l' esame batteriologico delle cavie morte ha dimostrato trattarsi in tutte di colera.

(1) Controlli.

uccideva sicuramente la cavia di 250 gr. entro le 24 ore e alla dose di un' ansa normale. Non avendo però a disposizione un numero sufficiente di animali di tal peso, dovetti valermi di un gruppo di cavie adulte (peso medio 450-500 gr.), per la cui morte in meno di 24 ore si richiedevano circa 6 anse di patina umida di 18 ore. Allestiti dunque i vaccini e inoculate con esse le cavie sotto cute, queste — sette giorni dopo — ricevettero nella cavità peritonale 1 $cm.^3$ di brodo contenente 6 grosse anse di patina umida per $cm.^3$.

Come si vede, il vaccino a base di vibrioni uccisi con i vapori di etere si è comportato in modo assai diverso da quello allestito con vibrioni trattati direttamente con l'etere liquido in eccesso: è evidente che in questo secondo caso l'azione del reattivo può esser più profonda, ed è anche diversa, ma non bisogna neppure dimenticare che nelle prove *in vitro* non si era punto notata una tal differenza fra i due trattamenti. Tale fenomeno meriterà pertanto di venire indagato più accuratamente.

A parte ciò, queste esperienze dimostrarono che il vaccino costituito dal filtrato degli autolizzati a 37° è alquanto meno efficace di quello tipo Kolle, perchè gli animali trattati con esso hanno mostrato di risentire per qualche tempo l'azione tossica dei vibrioni inoculati (1). Sicchè, tenendo pure conto della comodità e rapidità di preparazione, pareva giusto di dare senz'altro la preferenza al vaccino tipo Kolle. Ritenni nondimeno opportuno di inviare, oltre a questo, anche il vaccino Vincent al Prof. F. Micheli della R. Università di Siena, che volentieri aveva acconsentito di saggiarne la proprietà nell'uomo. Di queste sue ricerche egli accenna in un recente lavoro (2); al quale aggiungendo le notizie favoritemi direttamente, si giunge alle conclusioni seguenti: il vaccino ottenuto col riscaldamento a 53° è pochissimo tossico anche nella dose da me proposta di un miliardo di vibrioni, e dà certamente luogo ad abbondante produzione di agglutinine; il vaccino tipo Vincent produce effetti paragonabili al primo, ma talora accade che la produzione delle agglutinine è invece molto scarsa.

Può darsi che quest' ultimo fatto sia da ascriversi unicamente al modo speciale di reagire di qualche vaccinato; ma in ogni modo l' esperienze fin qui ricordate provano che il vaccino tipo Vincent allestito da me nel modo che fu detto da principio, è, per lo meno, non superiore al vaccino ottenuto per riscaldamento, mentre, d' altra parte, questo è di preparazione assai più comoda e rapida, ed è pure meno costoso.

Per ciò e per quanto è già noto intorno al valore pratico del vaccino Kolle propriamente detto, ho ritenuto di dover raccomandare, per le nostre truppe, la vaccinazione con vibrioni riscaldati a 53° per un'ora. E ho preferita tale temperatura a quelle di 58° o di 60°, usate di solito per i vaccini detti di Kolle, per più ragioni. Anzitutto dalle mie ricerche appare che la produzione delle agglutinine non è, con i

(1) Anche Serkowsky (St. Peterb. med. Woch. 1906, n. 13-15) ha trovato il vaccino Neisser-Shiga inferiore a quello di Kolle.

(2) F. Micheli e G. Quarelli — Saggi di vaccinazione anticolerica. (Il pensiero medico, 1915, n. 39) In questo lavoro vi è una piccola inesattezza: si parla del vaccino preparato da me con colture uccise dal calore come di qualcosa di diverso dal vaccino fornito dall' Istituto Sieroterapico Toscano, mentre in entrambi i casi si tratta di un prodotto ottenuto con la stessa tecnica e con le stesse colture. V. anche quanto è detto in fondo a questa mia Nota.

vibrioni scaldati a 60°, altrettanto abbondante che con quelli scaldati a 53°. D' altra parte Friedberger e Moreschi (1) hanno rilevato che i vibrioni uccisi a 100° hanno proprietà immunizzanti meno spiccate che i vibrioni uccisi a 60°. Siamo dunque dinanzi a un fenomeno generale, il quale ci persuade a ritenere che provocando la morte dei germi con temperature piuttosto basse, per es. inferiori a 58°-60°, se ne devono avere effetti anche migliori. E poichè mediante codesto riscaldamento a 53°, e non con riscaldamenti più elevati (Vincent (2)), si ottiene un eccellente vaccino antitifico (Castellani (3)), la scelta di quella temperatura per allestire il vaccino anticolerico, riesce anche utile per un eventuale bisogno di polivaccino anticolerico-antitifico, in quanto semplificherebbe e abbrevierebbe notevolmente, unificandole, le manipolazioni occorrenti per prepararlo.

Infine, per quella mia conclusione, ebbe pure importanza la notizia, che durante questa stessa guerra si sono ottenuti, presso un altro esercito e su grossi reparti di truppe, eccellenti effetti vaccinanti contro il colera mediante l' inoculazione di colture scaldate per l' appunto a 53° (4).

(1) loc. cit.

(2) C. R. Soc. Biol., T. 74, p. 847, 1913.

(3) Cfr.: Sperimentale, 1915, pag. 399: vi sono riassunti anche gl' importanti lavori dei Castellani sui polivaccini.

(4) Si vegga in proposito una nota di J. Raup nella Münch. med. Woch. 1915, n. 11, ove egli accenna pure ai danni di temperature d'uccisione elevate, come quella di 60°. Ricorderò poi che Savas, nella bella relazione sulla vaccinazione anticolerica in Grecia durante la 2ª guerra balcanica, dice di aver preparato per l'esercito un vaccino tipo Kolle, ma scaldato solamente a 56°, che diede ottimi resultati (Office int. d' hyg. publ. 1914, n. 10).

Riguardo alla dose di coltura morta da inocularsi nell'uomo, tenendo conto della esperienza del Castellani e del Kolle e anche delle prove fatte dal Micheli, proporrei quella di 1 miliardo di vibrioni, contenuti in 1 cm.^{3}, per la 1ª iniezione, salvo a raddoppiare questa quantità nella 2ª iniezione e nella 3ª, se si ritiene di doverla fare. La numerazione dei vibrioni può venire agevolmente eseguita mediante la coltura, in piastre d'agar, di diluizioni all' 1:1000-1 : 10000 ecc. dell'emulsione madre: si riduce ad un conteggio di colonie, che naturalmente darà solo valori approssimativi, ma, io credo, più attendibili e più uniformi che i calcoli fondati sulla grandezza delle patine o sul numero delle anse; senza dimenticare che in quella maniera si possono riconoscere immediatamente gli inquinamenti accidentali delle colture adoperate.

III.

Il metodo di preparazione del vaccino anticolerico, che io raccomando, comprende dunque una serie assai breve di operazioni e principalmente queste:

1°. Allestimento delle colture su agar speciale per il vibrione del colera, adoperando per ciò diversi stipiti virulenti, isolati, possibilmente, da epidemie in corso.

2°. Raccolta delle patine, dopo 16-18 ore di incubazione, mediante poca soluzione fisiologica e procurando di non asportare nulla dal terreno colturale. Le patine di quell'età si staccano facilmente in presenza della soluzione fisiologica agitata dolcemente; sicchè non occorre adoperare per le colture recipienti speciali, con dispositivi destinati a tener fermo l'agar, mentre si sbatte o si spruzza il liquido che serve a raccogliere i batterî. Servono anche bene delle bottiglie comuni schiacciate.

3°. L'emulsione madre, assai concentrata, così raccolta, dopo buona agitazione e dopo prelevato il campione per l'allestimento delle piastre in cui si farà il conteggio dei vibrioni, viene scaldata per un'ora a 53°. Questa temperatura — giova notarlo — è sufficiente a sterilizzare, in capo ad un'ora, emulsioni molto dense in grosso strato, se si ha l'avvertenza di agitarle un po' di tanto in tanto. Si può dunque portare a 53° l'emulsione madre e non le diluizioni di essa, ossia il vaccino propriamente detto; onde notevole risparmio di spesa e di fatica e d'apparecchi.

4°. Stabilito il contenuto microbico dell'emulsione madre, si procede alla sua diluizione con soluzione di NaCl al 0,85 % contenente il 0,5 % di fenolo, sterilizzata. La diluizione si fa in recipiente abbastanza ampio per potere agitare bene la massa; la quale in seguito viene distribuita in fialette, filtrandola contemporaneamente attraverso una esilissima falda di cotone, che non trattenga i corpi bacillari, ma solo i corpuscoli grossolani sospesi (sopratutto fiocchetti di cotone).

5°. Si controlla la sterilità dell'emulsione madre e del vaccino.

Appunto con tali norme, fin dal luglio di quest' anno, per gentile consenso del mio Maestro, Prof. Sclavo, l' Istituto Sieroterapico Toscano prepara il vaccino anticolerico, che è stato, come ognuno sa, distribuito molto largamente per i bisogni del nostro esercito. E l'esperienza ha dimostrato che il metodo corrisponde e fornisce un buon prodotto.

L'IGIENE MODERNA

PERIODICO MENSILE - Esce il 15 d'ogni mese

ANNO VIII, N. 11 — NOVEMBRE 1915

Condizioni d'Abbonamento

Per l'Italia L. 8 — per l'estero spese postali in più — Un numero separato LIRE UNA

Inserzioni a pagamento

Per ogni numero: Una pagina L. 30 — 1/2 pagina L. 16 — 1/4 di pagina L. 9
Ripetendosi l'inserzione per tre numeri successivi sconto 10 % — per sei numeri successivi sconto 20 % e per 12 numeri successivi sconto 30 %

PAGAMENTO ANTICIPATO

Direzione e Amministr.: Istituto d'Igiene - Via A. Bertani N. 5

GENOVA